

158, 652

BC 01

#7



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COPIE OFFICIELLE

LE DOCUMENT CI-ANNEXÉ EST LA COPIE CERTIFIÉE CONFORME,
D'UNE DEMANDE DE TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
ENREGISTRÉE A L'INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE.

publié
LE TITRE A ÉTÉ DELIVRÉ LE. 25. avril. 1986.....

ÉTABLIE A PARIS, LE. 26 JUIL. 1988.....

Pour le Chef de Service
Directeur de l'Institut national
de la propriété industrielle

L. Namur
L. NAMUR

DEMANDE DE
(voir case cochée)

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

LETTRE POSTALE 99

DUPLICATE
DE LA REQUÊTE

- ☒ BREVET D'INVENTION ☐ CERTIFICAT D'ADDITION
- ☐ CERTIFICAT D'UTILITÉ ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE
- ☐ TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

DEMANDE DIVISIONNAIRE OU TRANSFORMATION
NATURE N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES 18.10.84	DATE DE DÉPÔT 18/10/84
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 84 16013	

CABINET E GUTMAN ET
Y PLASSERAUD
67 BD HAUSSMANN
75008 PARIS

00000

LA

RÉFÉRENCE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE **EG/JTa - 101141080**

LE CAS ÉCHÉANT, DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL ET NUMÉRO
DE TÉLÉPHONE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

1) TITRE DE L'INVENTION **Virus purifié des lymphadénopathies et du syndrome d'immuno-dépression acquise, et antigènes d'enveloppe de ce virus, procédé d'obtention de ce virus et de ces antigènes d'enveloppe de ce virus, applications de ce virus ou de ces antigènes à la préparation de compositions immunogènes ou pour le diagnostic des susdites affections.**

2) DEMANDEUR : NOM ET PRÉNOMS (SOULIGNER LE NOM PATRONYMIQUE) OU

DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE

NUMÉRE DE
REVENDICATIONS **2**

N° SIREN, LE CAS ÉCHÉANT

- (1) INSTITUT PASTEUR**
(2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Etablissements publics

3) NATIONALITÉ **française**

4) ADRESSE COMPLÈTE

PAYS

- (1) 28, rue du Dr. Roux 75224 PARIS CEDEX 15**
(2) 15, quai Anatole France 75007 PARIS

France

5) INVENTEUR

LE DEMANDEUR EST-IL
L'INVENTEUR ?

☐ OUI
☒ NON

SI LE DEMANDEUR N'EST PAS L'UNIQUE
INVENTEUR OU SI LA RÉPONSE EST NÉ-
GATIVE, VOIR AU VERSO III c.

6) LE DEMANDEUR REQUIERT QUE
LE DÉPÔT DE LA DEMANDE SOIT DIFFÉRÉ

☐ OUI ☒ NON

LE DEMANDEUR REQUIERT LE
BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ
DE LA TAXE D'AVIS DOCUMENTAIRE
(VOIR AU VERSO)

☐ OUI ☒ NON

LE DEMANDEUR REQUIERT (OU A REQUIS)
LE BÉNÉFICE D'UNE DÉCISION DE
REDUCTION DES TAUX DE TAXE
(VOIR AU VERSO)

☐ OUI ☒ NON



DATE DE DÉPÔT (en chiffres arabes)	NUMÉRO

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE

N°

DATE DE DÉPÔT

ADDITIONS ANTÉRIEURES : 1er N°

2e N°

3e N°

4

4e N°

SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

CABINET PLASSERAUD

Par Procuration

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE AFFÉRÉNEMENT
DE LA DEMANDE

NOM ET QUALITÉ DU SIGNAIRE

61K ⑪ N° PUBLICATION 2 571 968 RR
 ⑫ N° ENREGISTREMENT NATIONAL 8 16013
 NATURE DU DOCUMENT A1 DEMANDE
 DE BREVET D'INVENTION
 ⑬ DATE DE DÉPÔT 18 OCTOBRE 1984
 ⑭ COPI DEMANDE N° 17 DU 25/04/86
 ⑮ DATE DE DÉLIVRANCE
 ⑯ BOPI DÉLIVRANCE N° DU
 ⑰ CLASSIFICATION INTERNATIONALE CLASST 4
 A61K 39/21 ;
 C12N 5/00 ;
 G01N 33/577#
 C12R 1:91
 DATE DE REMISE DES PIÈCES
 N° D'ENREGISTREMENT 8

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT 75
 DÉPÔT POSTAL - 99
 DEMANDE DIVISIONNAIRE OU TRANSFORMATION
 NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE
 00000
 CABINET E GUTMAN ET
 Y PLASSERAUD
 67 BD HAUSSMANN
 75008 PARIS

LE CAS ÉCHÉANT, DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL ET NUMÉRO
 DE TÉLÉPHONE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

1) TITRE DE L'INVENTION Virus purifié des lymphadénopathies et du syndrome d'immuno-dépression acquise, et antigènes d'enveloppe de ce virus, procédé d'obtention de ce virus et de ces antigènes d'enveloppe de ce virus, applications de ce virus ou de ces antigènes à la préparation de compositions immunogènes ou pour le diagnostic des susdites affections.

2) DEMANDEUR : NOM ET PRÉNOMS (SOULIGNER) LE NOM PATRONYMIQUE OU
 DÉSIGNATION ET FORME JURIDIQUE
 (1) INSTITUT PASTEUR
 (2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 Etablissements publics
 NOMBRE DE REVENDICATIONS 2
 N° SIREN, LE CAS ÉCHÉANT

3) NATIONALITÉ française
 4) ADRESSE COMPLETE
 (1) 28, rue du Dr. Roux 75724 PARIS CEDEX 15
 (2) 15, quai Anatole France 75007 PARIS
 PAYS France

5) INVENTEUR
 LE DEMANDEUR EST L'INVENTEUR ☒ oui ☐ non
 SI LE DEMANDEUR N'EST PAS L'UNIQUE INVENTEUR OU SI LA RÉPONSE EST NÉGATIVE, VOIR AU VERSO III c.
 LE DEMANDEUR REQUIERT LE BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ DE LA TAXE D'AVIS DOCUMENTAIRE (VOIR AU VERSO) ☒ oui ☐ non
 LE DEMANDEUR REQUIERT (OU A REQUIS) LE BÉNÉFICE D'UNE DÉCISION DE RÉDUCTION DES TAUX DE TAXE (VOIR AU VERSO) ☐ oui ☒ non



DATE DE DÉPÔT (en chiffres arabes)	NUMÉRO	Nbre
		P. de G. (Req) 1
		P. de G. (Pub) 1
		Des et Rev 8
		Avis Doc 1
		Pl. de Dessin 2
		DATE DE DÉPÔT D. Inventeurs 1
		Abrégé 1
		TOTAL 22

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION :
 NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE :
 ADDITIONS ANTERIEURES : 1er N° 2e N° 3e N°

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national 84 16013

Titre de l'invention :

"Virus purifié des lymphadénopathies et du syndrome d'immuno-dépression acquise, et antigènes d'enveloppe de ce virus, procédé d'obtention de ce virus et de ces antigènes d'enveloppe de ce virus, applications de ce virus ou de ces antigènes à la préparation de compositions immunogènes ou pour le diagnostic des susdites affections"

CABINET PLASSERAUD

Le (s) soussigné (s) 84, rue d'Amsterdam 75009 PARIS
mandataire des titulaires :

- (1) INSTITUT PASTEUR
- (2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

- (1) MONTAGNIER Luc
21, rue de Malabry 92350 LE PLESSIS ROBINSON France
- (2) KRUST Bernard
7, rue de Madagascar 75012 PARIS France
- (3) CHAMARET Solange
324, rue Lecourbe 75015 PARIS France
- (4) CLAVEL François
83, rue de l'Assomption 75016 PARIS France
- (5) CHERMANN Jean Claude
2 Clos d'Ergal 78310 ELANCOURT France
- (6) BARRE-SINOUSI Françoise
50, rue d'Erevan
92130 ISSY LES MOULINEAUX France



Date et 20 novembre 1984


signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

CABINET PLASSERAUD

Par Procuration

DOCUMENT

DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
		17, 18	+	20 11 84	12 DEC. 1984 MP

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

Virus purifié des lymphadénopathies et du syndrome d'immuno-dépression acquise, et antigènes d'enveloppe de ce virus, procédé d'obtention de ce virus et de ces antigènes d'enveloppe de ce virus, applications de ce virus ou de ces antigènes à la préparation de compositions immunogènes ou pour le diagnostic des susdites affections.

La présente invention est relative à un virus purifié des lymphadénopathies (ci-après désignées par l'abréviation SLA) et du syndrome d'immuno-dépression acquise (ci-après désigné sous l'abréviation SIDA), à un procédé d'obtention de ces antigènes des enveloppes de ces virus, à leurs applications à la préparation de compositions immunogènes ou pour le diagnostic des susdites affections.

Un rétrovirus présentant des caractérisations de l'agent étiologique du SIDA a été identifié. Il a fait l'objet d'une première description dans un article de F. Barré-Sinoussi et al, Science, 220, 868 (1983).

Ce rétrovirus présente les caractéristiques suivantes. Il est T-lymotrope ; sa cible préférée est constituée par les cellules Leu 3 (ou lymphocytes T4) ; il a une activité de reverse transcriptase nécessitant la présence d'ions Mg^{2+} et présente une forte affinité pour le poly(adénylate-oligodéoxy-thymidylate)[poly(A)-oligo(dT) 12-18] ; il a une densité de 1,16-1,17 dans un gradient de sucrose, un diamètre moyen de 139 nanomètres et un noyau ayant un diamètre moyen de 41 nanomètres ; les lysats de ce virus sont reconnus de façon immunologique, ces lysats contiennent une protéine p25 reconnue par les mêmes sérums mais qui n'est pas reconnue immunologiquement par la protéine p24 des virus HTLVI et II.

Des rétrovirus de ce type (quelquefois désignés par l'abréviation générique LAV) ont été déposés à la Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes de l'INSTITUT PASTEUR de Paris, sous les n° I-232, I-240 et I-241. Des souches de virus en tous points analogues sur les plans morphologiques et immunologiques ont été isolées



dans d'autres laboratoires ; on mentionnera pour mémoire la souche de rétrovirus dénommée HTLV-III (R.C. Gallo et al., Science, 224, 500 (1984) et M. G. Sarngadharan et al., Science 224, 506 (1984) et celle dénommée ARV, isolée par M. Jay Levy et al., Science, 225, 840-842 (1984). Il est également fait référence à la demande de brevet européen déposée le 14 septembre 1984, sous priorité de la demande britannique n° 83 24800 déposée le 15 septembre 1983 pour ce qui concerne une description plus détaillée des rétrovirus LAV ou analogues et des applications auxquelles des extraits de ces virus donnent lieu.

Seuls les antigènes internes (core) au virus ont pu être reconnus, après lyse du virus, par les sérums de patients affectés par le SIDA ou les SLA. Une protéine p41 a été décrite dans les susdits articles sur l'HTLV3 comme un composant possible de l'enveloppe du virus. Mais la preuve formelle qu'il s'agissait d'une protéine d'enveloppe n'a pas été apportée.

Des procédés pour obtenir un virus LAV ou un virus apparenté ont également été décrits. On peut notamment se référer à l'article déjà mentionné de F. Barré-Sinoussi et al., pour ce qui est de la préparation du virus dans des cultures de lymphocytes T provenant soit du sang, soit du cordon ombilical, soit également de cellules de moelle osseuse de donneurs adultes en bonne santé. Ce procédé comprend notamment les étapes essentielles suivantes :

- infection virale de ces lymphocytes T, après activation par une lectine mitogène, avec une suspension virale provenant d'un surnageant brut de lymphocytes producteurs du virus (initialement obtenus à partir d'un patient infecté par le SIDA ou le SLA),
- culture des cellules infectées avec du TCGF, en présence de sérum de mouton anti- α -interféron,
- purification du virus produit (la production commence généralement entre le neuvième et le quinzième jours suivant l'infection et dure de 10 à 15 jours) par précipita-



tion du virus dans du polyéthylèneglycol pour réaliser une concentration préalable du virus, puis centrifugation de la préparation dans un gradient de sucrose de 20 à 60 % ou dans un gradient isotonique de métrizanide (vendu sous la
 5 marque commerciale NYCODENZ par NYEGAARD, Oslo), le virus étant récupéré avec la bande de densité appropriée (1,16-1,17 dans le cas du gradient de sucrose ou 1,10-1,11 dans un gradient NYCODENZ).

Le virus LAV peut également être produit à partir
 10 de lignées continues du type T, telles que la lignée CEM, ou à partir de lignées cellulaires lymphoblastoïdes B, telles qu'obtenues par transformation de lymphocytes B provenant d'un donneur sain avec le virus d'Epstein-Barr. Les lignées obtenues sont alors capables de produire en
 15 continu un virus (LAV-B) qui possèdent les lignées antigéniques et morphologiques essentielles des virus LAV (si ce n'est qu'il est recueilli dans une bande de densité parfois légèrement plus élevée que dans le cas précédent, notamment 1,18) dans le sucrose. La purification finale du
 20 virus peut également être réalisée dans un gradient de NYCODENZ. On peut encore se reporter pour les techniques générales de production de virus du type B-LAV à la demande de brevet français déposée le 9 mai 1984 sous le n° 84 07151.

25 L'invention concerne une variété nouvelle de rétrovirus purifié, apparentée à celles qui ont été définies plus haut, mais qui s'en distingue (ou qui est caractérisée) par le fait que ces virus comportent un ou plusieurs antigènes, présentant les caractéristiques d'une glycoprotéine dans les tests qui sont décrits plus loin, ces
 30 antigènes pouvant être révélés par un marquage du virus avec de la cystéine marquée, notamment la ³⁵S-cystéine, en concentration suffisamment élevée à cet effet dans le milieu de culture du virus, notamment à raison de 200 microcuries par ml de milieu, dépourvue de cystéine non marquée. Ces antigènes sont reconnus de façon sélective par



les sérums de patients affectés par le SIDA ou les SLAs ou par les sérums de porteurs asymptomatiques du virus.

Un antigène préféré conforme à la précédente définition, tel qu'il peut être obtenu à partir d'un lysat de ce virus (ou par décapage doux des enveloppes du virus), a un poids moléculaire de l'ordre de 110.000 daltons, ce poids moléculaire pouvant être apprécié dans un système de distances de migrations comparées dudit antigène et de protéines de poids moléculaires (PM) respectivement connus, notamment des protéines suivantes (commercialisées par AMERSHAM) et de

- lysozyme-[^{14}C]-méthylé (PM : 14.300),
- anhydrate carbonique -[^{14}C]-méthylée (PM : 30.000),
- ovalbumine -[^{14}C]-méthylé (PM : 46.000),
- sérum albumine bovine [^{14}C]-méthylé (PM : 69.000),
- phosphorylase b -[^{14}C]-méthylée (PM : 92.500),
- myosine -[^{14}C]-méthylée (PM : 200.000).

Les migration comparées ont été réalisées sur gel de polyacrylamide à 12,5 %, puis sous tension de 35 V pendant 18 heures.

L'invention concerne encore les antigènes eux-mêmes, notamment celui de poids moléculaire d'environ 110.000, qui possèdent en outre la capacité d'être reconnus par des sérums de patients affectés par le SIDA ou le SLA ou par des sérums de personnes qui ont été exposées à des virus LAV ou analogues à celui-ci. Ces antigènes présentent encore la caractéristique de former des complexes avec la concanavaline A, ledit complexe pouvant être dissocié en présence de O-méthyl- α -D-mannopyranoside. Les antigènes selon l'invention peuvent encore se lier à d'autres lectines, par exemple celles connues sous la désignation "LENTYL-LECTINE". L'antigène préféré selon l'invention, de poids moléculaire 110.000, est également sensible à l'action des endoglycosidases. Cette action se manifeste par la production à partir de l'antigène de poids moléculaire 110.000 d'une protéine ayant un poids



moléculaire de l'ordre de 90.000, celle-ci pouvant être séparée par exemple par une immuno-précipitation ou par séparations en mettant en jeu les différences de poids moléculaires (migrations différenciées sur gel).

5 Les antigènes préférés de l'invention sont constitués par des glycoprotéines.

L'invention concerne encore un procédé pour produire les virus conformes à l'invention, ce procédé se distinguant essentiellement de ceux qui ont été rappelés
10 plus haut au niveau de l'opération de purification finale. En particulier, l'étape de purification du procédé selon l'invention n'est plus réalisée dans des gradients, mais implique la réalisation de centrifugations différentielles opérées directement sur les surnageants des milieux de
15 culture des cellules productrices. Ces opérations de centrifugation comprennent notamment une première centrifugation sous une vitesse angulaire de centrifugation, notamment 10.000 tours par minute, permettant l'élimination des constituants non viraux, plus particulièrement des
20 constituants cellulaires, puis une seconde centrifugation à une vitesse angulaire plus élevée, notamment à 45.000 tours par minute, pour obtenir la sédimentation du virus lui-même. Dans des modes de mise en oeuvre préférés, la première centrifugation, à 10.000 tours par minute, est
25 maintenue pendant 10 minutes et la seconde, à 45.000 tours par minute, pendant 20 minutes. Il ne s'agit bien entendu que de valeurs indicatives, étant entendu qu'il reste à la portée du spécialiste de modifier les conditions de centrifugation, dès lors qu'il prend soin de s'assurer de la
30 séparation des constituants cellulaires et des constituants viraux.



Cette modification du processus de purification conduit à l'obtention de préparations virales dont peut ensuite être isolé l'antigène mentionné. Celui-ci n'a
35 cependant pas été obtenu jusqu'à ce jour à partir des préparations de virus prépurifiés par les méthodes

antérieures. En tout état de cause, les virus finalement obtenus selon le procédé de la présente invention se distinguent des préparations virales précédentes, en ce qu'ils sont reconnus par des sérums de patients ou de

5 personnes qui ont été exposées au virus LAV ou à des souches morphologiquement et antigéniquement semblables.

L'antigène selon l'invention peut lui-même être obtenu à partir de ces derniers virus, par lyse (ou autre traitement approprié) de ceux-ci en présence de tout

10 détergent approprié et par récupération et séparation des antigènes libérés. Avantageusement, la lyse des virus est opérée en présence d'aprotinine ou de tout autre agent apte à inhiber l'action des protéases. La séparation des antigènes selon l'invention peut ensuite être opérée par

15 toute méthode en soi connue ; par exemple on peut procéder à une séparation des protéines en mettant en jeu leurs migrations respectivement différentes dans un gel déterminé, la protéine recherchée étant ensuite isolée de la zone du gel dans laquelle elle doit normalement se trouver

20 après une opération d'électrophorèse dans des conditions bien déterminées, eu égard à son poids moléculaire. L'antigène selon l'invention peut cependant être séparé du lysat des virus susdits, grâce à leur affinité pour les lectines, en particulier la concanavalline A ou la lentyl-lectine. La lectine utilisée est de préférence immobilisée

25 sur support solide, tel que le polymère réticulé à base d'agarose, et commercialisé sous la marque SEPHAROSE. Après mise en contact du lysat au sein d'un tampon approprié, l'antigène retenu peut être élué de toute façon appropriée, notamment en ayant recours à une solution de O-méthyl- α -D-mannopyranoside.

Une purification plus poussée de ces antigènes peut être réalisée par immuno-précipitation par des sérums de patients connus pour posséder des anticorps actifs contre

35 ladite protéine, avec des préparations concentrées d'anticorps (anticorps polyclonaux) ou encore avec des anticorps



monoclonaux, plus particulièrement orientés contre l'antigène selon l'invention, en particulier celui présentant le poids moléculaire de 110.000, ci-après désigné sous l'abréviation gp110.

5 Des caractéristiques supplémentaires de l'invention vont apparaître encore au cours de la description qui suit de l'isolement d'un virus conforme à l'invention et d'un antigène d'enveloppe de ce virus. Il sera fait référence à la fig. 1, qui est dérivée d'une reproduction photographique de bandes de gel qui ont été utilisées pour réaliser des électrophorèses d'extraits de lysats de lymphocytes T, respectivement infectés et non infectés (témoins) par une suspension de LAV.

10 Des lymphocytes T provenant d'un donneur sain et infectés avec LAV1, dans les conditions décrites par F. Barré-Sinoussi et Coll., ou des cellules CEM provenant d'un malade atteint de leucémie et également infectées in vitro avec LAV1, ont été maintenus en culture dans un milieu contenant 200 microcuries de ³⁵S-cystéine et dépourvu de cystéine non marquée. Les lymphocytes infectés sont maintenus en culture en milieu non dénaturant pour prévenir la dégradation de l'antigène recherché. Le surnageant du milieu de culture est ensuite soumis à une première centrifugation à 10.000 tours par minute pendant 10 minutes, pour éliminer les constituants non viraux, produits à 45.000 tours par minute pendant 20 minutes, pour produire la sédimentation du virus. Le culot de virus est alors lysé à l'aide de détergent, en présence d'aprotinine (5 %) notamment dans les conditions décrites dans l'article de F. Barré-Sinoussi et Coll..

Les mêmes opérations sont répétées sur des lymphocytes provenant d'un donneur sain à titre de témoin.

Les différents lysats sont ensuite immunoprécipités par des sérums de patients affectés de SIDA ou de SLA, ainsi qu'avec des sérums provenant de donneurs sains ou affectés par d'autres maladies. Les milieux ont ensuite



été soumis à électrophorèse dans un gel de SDS-polyacrylamide.

Les résultats sont indiqués dans la fig. 2. Les bandes de gel numérotées de 1 à 6 ont été obtenues à partir des préparations marquées par la ^{35}S -cystéine. Les bandes numérotées 7 à 10 correspondent aux résultats observés sur des préparations de lymphocytes infectés ou non infectés, marqués par la ^{35}S -méthionine. Enfin la bande M correspond aux distances de migration des protéines de référence identifiées plus haut, dont les poids moléculaires ont été rappelés dans la partie droite de la figure.

A la gauche de la figure sont référencées les protéines virales qui ont été repérées.

On remarque que les colonnes 7 à 9 font apparaître la protéine p25 spécifique de LAV, marquée par la ^{35}S -méthionine, la même protéine étant absente des colonnes 8 et 10 correspondant à une observation faite sur des préparations obtenues à partir de lymphocytes sains.

Les colonnes 3 et 5 correspondent aux résultats qui ont été observés sur des préparations obtenues à partir de lymphocytes infectés et marqués par la ^{35}S -cystéine. On retrouve à la fois les protéines p25 et p18 caractéristiques des protéines du nucléotide du LAV et la glycoprotéine gp110 également spécifique de LAV. On voit également apparaître dans les différentes préparations, bien que moins nettement, des images correspondant à une protéine p41 (poids moléculaire de l'ordre de 41.000) et non spécifique du virus LAV. Elle est observée également chez les témoins.

Le virus selon l'invention et l'antigène selon l'invention peuvent être soit précipités par des lectines, notamment la concanavaline A, ou fixés à une colonne de SEPHAROSE-concanavaline A. Cette fixation peut notamment être opérée par la mise en contact du lysat du susdit virus au sein d'un tampon permettant la composition



suivante :

Tris	10 mM
NaCl	0,15 M
CaCl ₂	1 mM
5 MgCl ₂	1 mM

Détergent commercialisé sous la marque TRITON 1 %

pH 7,4

Une fois la fixation réalisée, on lave le SEPHA-ROSE-concanavaline A avec un tampon de même composition, si ce n'est la teneur en TRITON qui est abaissée à 0,1 %. L'élution est ensuite réalisée avec une solution 0,2 M, O-méthyl- α -D-mannopyranoside, au sein du tampon de lavage.

La protéine peut être davantage concentrée par immunoprécipitation avec les anticorps contenus dans des sérums de patients affectés du SIDA ou avec des anticorps polyclonaux obtenus à partir d'un sérum provenant d'un animal préalablement immunisé contre le virus selon l'invention ou la glycoprotéine susdite. La protéine peut alors être récupérée par dissociation du complexe par une solution ayant une teneur adéquate en sel ionique.

De préférence les susdites préparations d'anticorps ont préalablement été immobilisées de façon en soi connue sur un support insoluble du type SEPHAROSE B.

On peut également avoir recours à des anticorps monoclonaux sécrétés par des hybridomes préalablement préparés contre gp110. Ces anticorps monoclonaux, ainsi que les hybridomes qui les produisent, font également partie de l'invention.

On décrit ci-après les conditions dans lesquelles les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être préparés.

Immunisation des souris

Des groupes de souris Balb/c âgées de 6 à 8 semaines ont été utilisées. Un groupe a reçu le virus comportant la susdite glycoprotéine, un autre la glycoprotéine gp110. Le protocole d'immunisation, identique pour



les 4 souris, consistait en l'injection, par voie intrapéritonéale à trois reprises, puis une fois par voie intraveineuse, de 10 µg de la préparation antigénique en présence d'adjuvant complet de Freund au jour 0, d'adjuvant incomplet de Freund au jour 14 et sans adjuvant aux jours 28 et 42.

Fusion et culture des hybrides

Le variant 6.53 non sécréteur du myélome P3 X 63 Ag8, résistant à l'azaguanine, provenant lui-même de la lignée MOPC-21, a été utilisé. La fusion avec les splénocytes de souris immunisées a été réalisée en présence de polyéthylène-glycol 4.000 selon la technique de FASEKAS DE ST-GROTH et SCHEIDEGGER au 45ème jour (8). La sélection des hybrides en milieu RPMI 16-40 "HAT" a été effectuée selon la même technique de culture dans des plaques de 24 puits (Costar).

Les hybridomes producteurs d'anticorps de spécificité adéquate ont ensuite été clonés en plaques de 96 puits, en présence d'une couche nourricière ("feeder") de thymocytes syngéniques. Les clones producteurs ainsi sélectionnés ont alors été mis en expansion dans des plaques de 24 puits, toujours en présence de thymocytes. Lorsque la confluence apparaissait dans un des puits, le clone était injecté par voie intrapéritonéale à une souris BALB/c ayant reçu une injection de Pristane 8 jours auparavant et/ou maintenu en culture liquide.

Mise en évidence des anticorps anti-LAV

Cinq techniques différentes ont permis de caractériser les clones produisant des anticorps de spécificité intéressante. Dans un premier temps, on a déterminé les hybrides produisant des anticorps par une épreuve ELISA révélant les immunoglobulines de souris dans les surnageants. A partir de cette première sélection, on a recherché les surnageants qui présentaient des anticorps dirigés contre des constituants viraux à l'aide d'une épreuve ELISA révélant des anticorps anti-LAV (9), ou par



l'immunofluorescence sur cellules humaines productrices de virus. Enfin, les surnageants ont été analysés par radio-immunoprécipitation de virus marqué à la ^{35}S -cystéine et par la technique du Western-Blot sur préparation virale
 5 (10) qui permettait de déterminer les spécificités de ces anticorps anti-LAV.

RESULTATS

Les cellules obtenues à partir des différentes fusions ont été mises en culture dans 648 puits. L'examen
 10 microscopique a montré que la plupart de ces puits contenaient un seul clone hybride capable de pousser en milieu sélectif "HAT". Plus de 50 % d'entre eux produisaient des anticorps donnant lieu à une réponse positive à l'examen ELISA antiviral. Les fusions les plus représentatives
 15 ont été testées par la technique du Western-Blot et plusieurs d'entre elles ont été sous-clonées, compte tenu de leur spécificité, de leur réactivité en ELISA antiviral et de leur comportement en culture. On a plus particulièrement retenu les hybrides qui ont produit des anticorps qui
 20 reconnaissaient la glycoprotéine de poids moléculaire correspondant à la glycoprotéine virale gp110. Tous les sous-clonages ont donné lieu à des clones producteurs d'anticorps qui, après expression, ont été injectés à des souris syngéniques. L'analyse des spécificités des anticorps
 25 présents dans les différents liquides d'ascite a confirmé la spécificité des anticorps desdites ascites à l'égard de gp110.



30 Les anticorps monoclonaux obtenus peuvent eux-mêmes être mis en oeuvre pour purifier des protéines contenant un site antigénique également contenu dans gp110. L'invention concerne donc également ce procédé de purification en tant que tel. Ce procédé est avantageusement appliqué à des lysats de virus ou des lysats de lymphocytes T ou toutes autres cellules productrices de LAV ou analogue, dès
 35 lors qu'avant la lyse on aura pris le soin d'éviter la séparation non contrôlée de gp110 (étant entendu que la

méthode peut également être appliquée à toute solution contenant gp110 ou une protéine, polypeptide ou glycoprotéine comportant un site antigénique de protéine d'enveloppe, reconnu par l'anticorps monoclonal, quelle que soit la nature de cette solution). Pour la mise en oeuvre de ce procédé, les anticorps monoclonaux sont avantageusement immobilisés sur un support solide, de préférence adapté à des opérations de chromatographie d'affinité. Par exemple, ces anticorps monoclonaux sont fixés sur un réseau d'agarose à réticulation tri-dimensionnelle, commercialisé sous la marque SEPHAROSE par la société suédoise PHARMACIA A.G., par exemple par la méthode au bromure de cyanogène.

L'invention concerne donc plus particulièrement un procédé de séparation de ces antigènes caractérisés par les opérations consistant à faire passer le milieu susceptible de les contenir au contact d'une colonne d'affinité portant les susdits anticorps monoclonaux, pour fixer sélectivement lesdits polypeptides, protéines ou glycoprotéines puis à récupérer ceux-ci par dissociation du complexe antigène-anticorps au moyen d'un tampon approprié, notamment d'une solution de force ionique adéquate, par exemple d'un sel, de préférence l'acétate d'ammonium (lequel ne laisse pas de résidu lorsque l'on réalise ensuite la lyophilisation de la préparation). On peut également avoir recours à une solution acidifiée à pH 2-4 ou à un tampon glycine au même pH.



Ces antigènes sont eux-mêmes susceptibles d'être utilisés comme réactifs, ou même comme agents de diagnostic in vitro, pour la détection d'anticorps anti-LAV. Il va de soi que l'invention concerne également des fractions polypeptidiques pouvant avoir des poids moléculaires plus faibles, dès lors qu'elles porteraient des sites antigéniques susceptibles d'être reconnus par les mêmes anticorps monoclonaux. Il apparaîtra clairement au spécialiste qu'à partir de l'instant où l'on dispose des

anticorps monoclonaux selon l'invention, on peut envisager l'isolement, à partir des antigènes sus-indiqués, des séquences peptidiques plus petites contenant les mêmes sites antigéniques, par exemple en ayant recours à des techniques en soi connues de découpage du polypeptide initial par des enzymes susceptibles de découper les polypeptides plus grands en des sites spécifiques. A titre d'exemple de telles protéines, on peut mentionner l'enzyme de Staphylococcus aureus V8, l'alpha-chymotrypsine, la "protéase de glande sous-maxillaires de souris" (mouse submaxillary gland protease) commercialisée par la société BOEHRINGER, la collagénase de Vibrio alginolyticus chemovar iophagus, qui reconnaît spécifiquement lesdits peptides Gly-Pro et Gly-Ala, etc..

On peut encore rechercher des polypeptides ou fragments d'antigènes d'enveloppes du virus, un clonant des fragments excisés à partir d'un cADN construit à partir des génomes des diverses variétés de virus LAV et analogues.

La fig. 2 est représentative de cartes de restriction de certains de ces cADNs, comprenant un total de 9,1 à 9,2 kb. On s'intéressera plus particulièrement aux polypeptides codés par des fragments de cADN situés dans la région s'étendant entre le site KpnI (position 6100) vis-à-vis des cartes de restriction de la fig. 2 et le site BglII (position 9150). La présence d'un site caractéristique d'un antigène d'enveloppe du virus LAV ou analogue dans le polypeptide susceptible d'être exprimé (dans un hôte cellulaire approprié préalablement transformé par un tel fragment ou par un vecteur contenant ce fragment) peut être détecté par toute méthode immunochimique appropriée.

Les antigènes du genre en question peuvent également être utilisés pour séparer des anticorps présentant les caractéristiques sus-indiquées à partir d'un mélange polyclonal d'anticorps. Dans ce cas, les polypeptides du genre en question seront à leur tour immobilisés sur un



support de chromatographie d'affinité, par exemple du genre indiqué plus haut. Le procédé de séparation comprendra par conséquent l'étape consistant à faire passer une solution contenant les anticorps polyclonaux au
 5 contact des polypeptides immobilisés, et l'étape de récupération des anticorps retenus au moyen d'une solution ou d'un tampon analogue à celle ou celui qui a été envisagé plus haut.

Enfin l'invention concerne des compositions immunogènes caractérisées par l'association d'un antigène conforme à l'invention, en tant que principe immunogène, notamment à raison de 10 à 500, par exemple de 50 à 100 microgrammes/kg, avec un excipient physiologiquement acceptable permettant son administration à un hôte vivant,
 10 plus particulièrement l'homme, en vue de lui conférer une immunité à l'égard desdits antigènes, y inclus les virus LAV ou analogues entiers. Ces antigènes constituent des principes actifs dont l'immunogénicité peut être mise en oeuvre à chaque fois qu'est recherchée une protection in
 15 vivo contre des virus LAV ou des virus qui leur sont apparentés.

L'invention concerne également un procédé utilisant les antigènes selon l'invention pour la détection de la présence d'anticorps anti-LAV, notamment dans des échantillons sanguins provenant de l'homme ou de l'animal, en
 25 vue d'effectuer la détection du SIDA ou des SLAs.



Enfin l'invention concerne un procédé de diagnostic in vitro mettant en jeu un antigène d'enveloppe conforme à la présente invention pour la détection d'anticorps anti-LAV dans le sérum de patients affectés de la maladie ou de
 30 personnes immunisées contre le virus. Elle concerne plus particulièrement un nécessaire ou "kit" comprenant cet antigène.

Le procédé de diagnostic comprend notamment :
 35 - le dépôt de quantités déterminées d'un antigène conforme à la présente invention dans les puits d'une microplaque

de titrage ;

- l'introduction dans ces puits de dilutions croissantes du sérum à diagnostiquer ;
- l'incubation de la microplaque ;
- 5 - le lavage soigneux de la microplaque ;
- l'introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués spécifiques d'immunoglobulines du sang, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat de telle sorte
- 10 que ce dernier subit alors une modification de son absorption des radiations, au moins dans une bande de longueurs d'ondes déterminée et
- la détection, de préférence de façon comparative par rapport à un témoin, de l'importance de l'hydrolyse du
- 15 substrat en tant que mesure des risques potentiels ou de la présence effective de la maladie.

Bien entendu, on peut réaliser des titrages quantitatifs d'anticorps sur les sérums étudiés.

- Des méthodes préférées mettent en jeu des titrages
- 20 immuno-enzymatiques ou immunofluorescents, en particulier conformément à la technique ELISA. Les titrages peuvent être des dosages par immunofluorescence ou des dosages immuno-enzymatiques directs ou indirects.

25



35

REVENDEICATIONS

1 - Virus purifié du type LAV caractérisé par le fait qu'il comporte un antigène d'enveloppe ayant un poids moléculaire de l'ordre de 110.000 daltons.

5 2 - Antigène d'enveloppe de virus LAV ou analogues ayant un poids moléculaire de l'ordre de 110.000 daltons.



REVENDICATIONS

1 - Rétrovirus présentant les caractéristiques de l'agent étiologique du SIDA, et plus particulièrement des rétrovirus LAV, caractérisé par le fait qu'il comporte un ou plusieurs antigènes présentant les caractéristiques d'une glycoprotéine et pouvant être révélés par un marquage du virus à l'aide d'une concentration élevée de ³⁵S-cystéine, notamment à raison de 200 microcuries par millilitre de milieu, et ce en l'absence de cystéine non marquée, ces antigènes étant en outre reconnus de façon sélective par des sérums de patients affectés par le SIDA ou le SLA, ou encore par des sérums de porteurs asymptomatiques du virus.

2 - Rétrovirus selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'il comporte un antigène d'enveloppe ayant un poids moléculaire de l'ordre de 110.000 daltons.

3 - Antigène ayant un poids moléculaire d'environ 110.000 ou antigène de poids moléculaire plus faible dérivé du précédent, qui possède la capacité d'être reconnu par des sérums de patients affectés par le SIDA ou le SLA ou par des sérums de porteurs asymptomatiques du virus.

4 - Antigène selon la revendication 3, qui présente encore la caractéristique de former des complexes avec la concanavaline A, ledit complexe pouvant être dissocié en présence de O-méthyl- α -D-mannopyranoside.

5 - Antigène selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'il peut également se lier à d'autres lectines.

6 - Antigène selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, qui présente un poids moléculaire de l'ordre de 110.000 daltons et qui est également sensible à l'action des endoglycosidases.

7 - Procédé d'obtention d'un rétrovirus conforme à la revendication 1 ou à la revendication 2, comprenant l'infection de lignées de lymphocytes T ou de lignées cellulaires lymphoblastoïdes B, la culture de ces cellules



infectées et la purification du virus obtenu, caractérisé en ce que l'étape de purification finale du virus comprend la réalisation de centrifugations différentielles opérées directement sur les surnageants des milieux de culture des
5 cellules productrices et la récupération du virus final, lequel est marquable avec de la ^{35}S -cystéine utilisée en concentrations élevées et en l'absence de cystéine non marquée.

8 - Procédé d'obtention d'un antigène conforme à
10 l'une quelconque des revendications 3 à 6, comprenant l'isolement de cet antigène à partir du virus purifié obtenu à l'issue de la revendication 7, notamment par lyse de ce virus ou décapage des enveloppes de ce virus, et la séparation des antigènes qui ont la capacité d'être re-
15 connus par des sérums de patients affectés par le SIDA ou le SLA, plus particulièrement de celui qui présente un poids moléculaire de l'ordre de 110.000.

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séparation de l'antigène comprend la mise en
20 contact du milieu contenant l'antigène, tel qu'obtenu à l'issue du procédé défini dans la revendication 8, avec une lectine affine, telle que la concanavaline A ou la lentyl-lectine, cette lectine étant de préférence immobilisée sur un support solide, puis l'élution du susdit
25 antigène, notamment à l'aide d'une solution de O-méthyl- α -D-mannopyranoside.

10 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite purification est réalisée par immuno-
précipitation par les sérums de patients connus pour pos-
30 séder des anticorps actifs contre ledit antigène ou encore avec des anticorps monoclonaux produits par des hybridomes préalablement formés et sécrétant lesdits anticorps monoclonaux, ceux-ci reconnaissant plus particulièrement l'antigène conforme à l'une quelconque des revendications 3 à
35 6.



11 - Anticorps monoclonal caractérisé par sa capacité à reconnaître spécifiquement l'antigène conforme à la revendication 6.

5 12 - Les hybridomes sécréteurs de l'anticorps monoclonal selon la revendication 11.

13 - Composition immunogène caractérisée par l'association d'un antigène conforme à l'une quelconque des revendications 3 à 6, avec un excipient physiologiquement acceptable, permettant son administration à un hôte vivant, plus particulièrement l'homme.

14 - Composition immunogène selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est dosée en antigène de façon à permettre l'administration d'une dose de 10 à 500, notamment de 50 à 100 microgrammes par kilogramme.

15 15 - Procédé de diagnostic comprenant :

- le dépôt de quantités déterminées d'un antigène selon l'une quelconque des revendications 3 à 6 dans les puits d'une microplaque de titrage ;
- l'introduction dans ces puits de dilutions croissantes du sérum à diagnostiquer ;
- l'incubation de la microplaque ;
- le lavage soigneux de la microplaque ;
- l'introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués spécifiques d'immunoglobulines du sang, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat de telle sorte que ce dernier subit alors une modification de son absorption des radiations, au moins dans une bande de longueurs d'ondes déterminée et
- 25 - la détection, de préférence de façon comparative par rapport à un témoin, de l'importance de l'hydrolyse du substrat en tant que mesure des risques potentiels ou de la présence effective de la maladie.





1/2

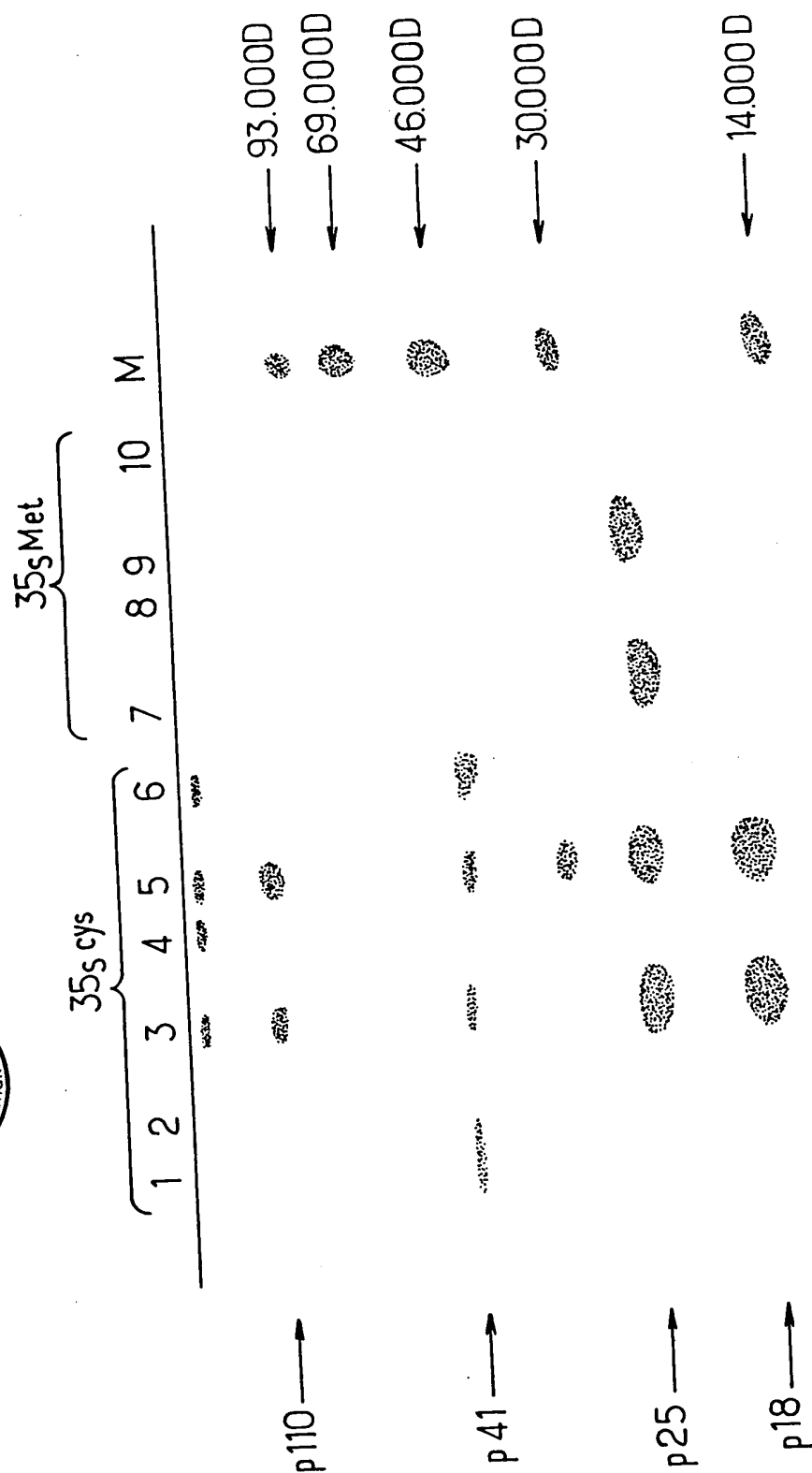
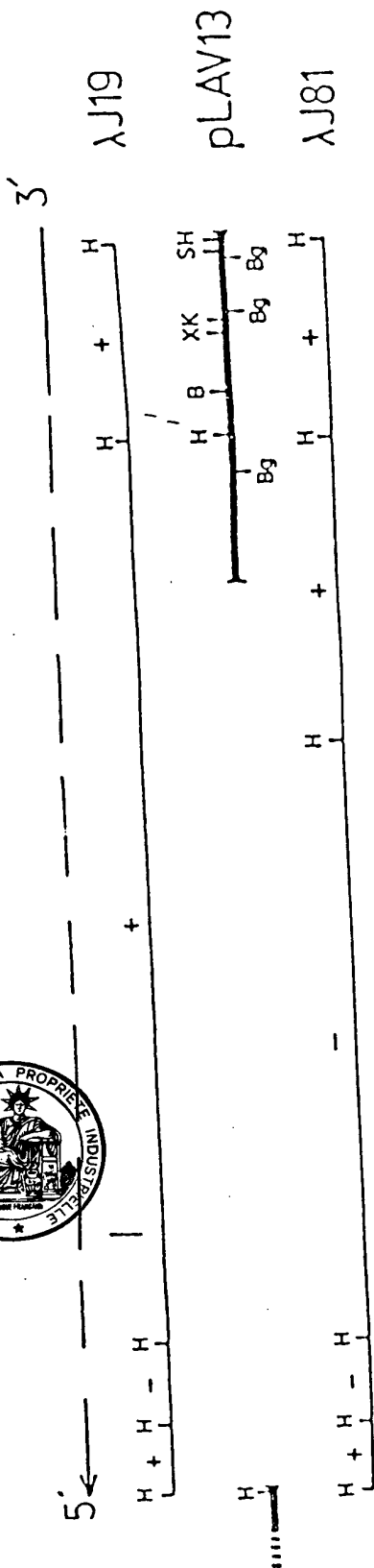


FIG.1.



2/2

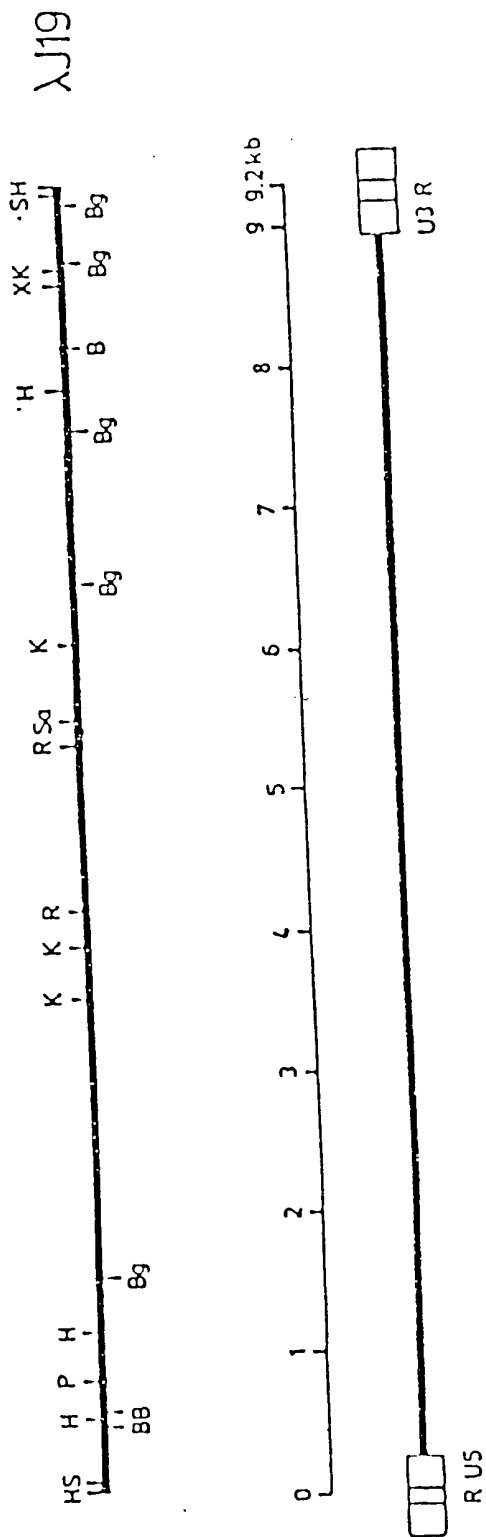


FIG. 2.

H = Hind III K = Kpn I
 S = Sac I R = EcoRI
 B = Bam HI Sa = Sal I
 P = Pst I X = XhoI
 Bg = Bgl II

REVENDICATIONS

1 - Antigène purifié ayant un poids moléculaire d'environ 110.000 ou antigène de poids moléculaire plus faible dérivé du précédent, qui possède la capacité d'être reconnu par des sérums de porteurs asymptomati-
5 ques du virus.

2 - Antigène selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en une glycoprotéine.

3 - Antigène selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé par le fait qu'il consiste en
10 un antigène de l'enveloppe du rétrovirus LAV, cet antigène pouvant être révélé par un marquage du virus à l'aide d'une concentration élevée de ³⁵S-cystéine, notamment à raison de 200 microcuries par millilitre de milieu, et ce en l'absence de cystéine non marquée.

15 4 - antigène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, qui présente encore la caractéristique de former des complexes avec la concanavaline A, ledit complexe pouvant être dissocié en présence de O-méthyl- α -D-mannopyranoside.

20 5 - Antigène selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il peut également se lier à d'autres lectines.

25 6 - Antigène selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il est également sensible à l'action des endoglycosidases.

7 - Procédé d'obtention d'un rétrovirus portant un antigène conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 6 et susceptible d'être révélé par un marquage du virus à l'aide d'une concentration élevée de ³⁵-

30 cystéine, notamment à raison de 200 microcuries par millilitre de milieu, et ce en l'absence de cystéine non marquée, ce procédé comprenant l'infection de lignées de lymphocytes T ou de lignées cellulaires lymphoblastoïdes B, la culture de ces cellules



infectées et la purification du virus obtenu, caractérisé en ce que l'étape de purification finale du virus comprend la réalisation de centrifugations différentielles opérées directement sur les surnageants des milieux de culture des cellules productrices et la récupération du virus final, lequel est marquable avec de la 35 S-cystéine utilisée en concentrations élevées et en l'absence de cystéine non marquée.

8 - Procédé d'obtention d'un antigène conforme à l'une quelconque des revendications 3 à 6, comprenant l'isolement de cet antigène à partir du virus purifié obtenu à l'issue de la revendication 7, notamment par lyse de ce virus ou décapage des enveloppes de ce virus, et la séparation des antigènes qui ont la capacité d'être reconnus par des sérums de patients affectés par le SIDA ou le SLA, plus particulièrement de celui qui présente un poids moléculaire de l'ordre de 110.000. —

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séparation de l'antigène comprend la mise en contact du milieu contenant l'antigène, tel qu'obtenu à l'issue du procédé défini dans la revendication 8, avec une lectine affine, telle que la concanavoline A ou la lentyl-lectine, cette lectine étant de préférence immobilisée sur un support solide, puis l'élution du susdit antigène, notamment à l'aide d'une solution de O-méthyl- α -D-mannopyranoside.

10 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite purification est réalisée par immunoprécipitation par les sérums de patients connus pour posséder des anticorps actifs contre ledit antigène ou encore avec des anticorps monoclonaux produits par des hybridomes préalablement formés et sécrétant lesdits anticorps monoclonaux, ceux-ci reconnaissant plus particulièrement l'antigène conforme à l'une quelconque des revendications 3 à 6.



11 - Anticorps monoclonal caractérisé par sa capacité à reconnaître spécifiquement l'antigène conforme à la revendication 6.

12 - Les hybridomes sécréteurs de l'anticorps monoclonal selon la revendication 11.

13 - Composition immunogène caractérisée par l'association d'un antigène conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 6, avec un excipient physiologiquement acceptable, permettant son administration à un hôte vivant, plus particulièrement l'homme.

14 - Composition immunogène selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est dosée en antigène de façon à permettre l'administration d'une dose de 10 à 500, notamment de 50 à 100 microgrammes par kilogramme.

15 - Procédé de diagnostic comprenant :

- le dépôt de quantités déterminées d'un antigène selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans les puits d'une microplaque de titrage ;
- l'introduction dans ces puits de dilutions croissantes du sérum à diagnostiquer ;
- l'incubation de la microplaque ;
- le lavage soigneux de la microplaque ;
- l'introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués spécifiques d'immunoglobulines du sang, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat de telle sorte que ce dernier subit alors une modification de son absorption des radiations, au moins dans une bande de longueurs d'ondes déterminée et
- la détection, de préférence de façon comparative par rapport à un témoin, de l'importance de l'hydrolyse du substrat en tant que mesure des risques potentiels ou de la présence effective de la maladie.





#7

VERIFICATION OF A TRANSLATION
(VERIFICATION D'UNE TRADUCTION)

I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below :

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified French application was filed, and that I believe the English translation of the French application

N° 84 16013 filed on October 18, 1984

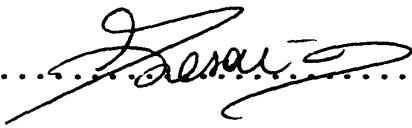
in the name of Institut Pasteur and Centre National de la Recherche Scientifique.

is a true and complete translation of the above identified French application as filed.

Date

.....October 11, 1988.....

Full name of the translatorDESAIX Anne.....
(nom et prénom du traducteur)

Signature of the translator.....
(signature du traducteur)

Post Office Address)S.C. ERNEST GUTMANN YVES PLASSERAUD.....
(adresse postale)67 boulevard Haussmann.....
.....75008 PARIS (FRANCE).....

APPLICATION FOR (see checked box)

Postal code of locality
of filingDUPLICATE OF
THE APPLICATION☒ Patent of Invention

Certificate of Addition

75

Certificate of Utility

Divisional Application

Postal filing 99

Transformation from European
Patent ApplicationDivisional or Conversion Application
Nature, No. and date of initial application:Date of
Sending
Papers

18/10/84

Filing Date

18/10/84

Name and address of Applicant or of Agent
to whom all correspondence should be
addressedNational Registration
No.

84 16013

Cabinet E GUTMANN ET
Y. PLASSERAUD 67 bld Haussmann 75008 PARISIf necessary, date of General
Power and Telephone No.
of Applicant or AgentReference of Applicant
or Agent

EG/JTa - 101141080

1) Title of the invention Purified virus of lymphadenopathies and of the acquired immuno-depressive syndrome and of the envelope antigens of this virus, process for producing this virus and of these envelope antigens of this virus, Use of this virus or of these antigens in the preparation of immunogenic compositions or for the diagnosis of the above-said diseases

2) Applicant: Name and forename (underline family name) or
legal name and form:

No. of Claims

Sirene No., if necessary

2

(1) INSTITUT PASTEUR

(2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Public establishments

3) Nationality/

French

Country

France

4) Complete address

(1) 28, rue du Dr. Roux 75724 PARIS CEDEX 15

(2) 15, quai Anatole France 75007 PARIS

(5) Inventor

Applicant is Yes
the inventor x NoIf Applicant is not the sole inventor or if the
reply is negative, see on back IIic.

6) Applicant requests that *
establishment of the prior
art opinion be deferred
(see back)

Yes
x No

Applicant requests benefit *
of the payment in instal-
ments of the prior art
opinion tax
(see back)

Yes
x No

Applicant requests *
or has requested bene-
fit of a decision to
reduce the tax levels
(see back)

7) Priority Declaration
Original Country

Filing Date (in arabic figures)

Number

8) Attachment of Certificate of Addition:
Nature of the principal application

No.

Filing Date

Prior additions: 1st No.

2nd No.

3rd No.

4th No.

Signature of Applicant or his Agent

Signature of Official Receipt

Signature after registration of
the application at I.N.P.I.

CABINET PLASSERAUD

By Procuration

Sgd. Illeg.

Sgd. Illeg.

FRENCH REPUBLIC

NATIONAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY

PRINTED STAMP
OF THE FRENCH
PATENT OFFICE

OFFICIAL COPY

The attached document is the certified true copy
of an application for title of Industrial Property
registered at the National Institute of Industrial
Property.

The title has been published on April 25, 1986.

Established at Paris, the

September 30, 1988

For the

Director of the National Institute
of Industrial Property

Head of the Division

(Sgd.)

Y. Campenon

COVER PAGE

RR

Publication number : 2 571 968
 National Registration number : 84 16013
 Type of document : A1 Patent application

Filing date : October 18, 1984
 BOPI application n° 17 of April 25, 1986

Date of Grant

BOPI Grant number

International Classification : CLASST 4

A61K 39/21 ;

C12N 5/00

GOIN 33/577*

C12R 1:91

Postal Code of place of filing

Postal filing 99

75

Divisional or Conversion Application

Nature, No., and Date of Initial Application

Name and Address of Applicant or Agent to whom all
 correspondence should be addressed: **CABINET**
E GUTMANN et Y PLASSERAUD
67 bl Haussmann 75008 PARIS

As the case may be, date of the General Power and
 telephone number of Applicant or Agent

1) Title of Invention (54) Purified virus of lymphadenopathies and of the acquired immuno-depressive syndrome and of the envelope antigens of this virus, process for producing this virus and of these envelope antigens of this virus, use of this virus or of these antigens in the preparation of immunogenic compositions or for the diagnosis of the above-said diseases.

2) Applicant: Name and forenames (underline the
 family name) or name and legal form (11)

No. of Claims

Sirene No., as the case may be

2

(1) INSTITUT PASTEUR

(2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Public establishments

3) Nationality

French

4) Complete Address

Country

France

~~(1) 28, rue du Dr. Roux 75724 PARIS CEDEX 15~~~~(2) 15, quai Anatole France 75007 PARIS~~

Inventor (12)

Applicant is the
inventor

Yes

x No

If Applicant is not the sole inventor or if the reply
 is negative, see back IIIc.

6) Applicant requests the *
 establishment of the
 prior art opinion be
 deferred Yes x No
 (see back)

Applicant requests the *
 payment in installments
 of the prior art opinion
 tax Yes x No
 (see back)

Applicant requests or has *
 requested benefit of a
 decision to reduce the
 tax levels Yes x No
 (see back)

7) Priority declaration (30)
 Country of Origin (31)

Filing Date (32)
 (in arabic figures)

Number (33)

8) Attachment of a Certificate of Addition
 Nature or principal Application

No.

Filing Date

Prior Additions No. 1

No. 2

No. 3

No. 4

NATIONAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY

ADMINISTRATIVE DIVISION OF PATENTS

DESIGNATION OF INVENTOR

(If the Applicant is not the inventor
or the only inventor)

National Registration No.

84 16013

Title of the invention :

Purified virus of lymphadenopathies and of the acquired immuno-depressive syndrome and of the envelope antigens of this virus, process for producing this virus and of these envelope antigens of this virus, use of this virus or of these antigens in the preparation of immunogenic compositions or for the diagnosis of the above-said diseases.

The undersigned CABINET PLASSERAUD
84, rue d'Amsterdam
75009 PARIS

Agent of the proprietors:

- (1) INSTITUT PASTEUR
- (2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

name as inventor(s) (name, forenames, address)

- (1) MONTAGNIER Luc
21, rue de Malabry 92350 LE PLESSIS ROBINSON France
- (2) KRUST Bernard
7, rue de Madagascar 75012 PARIS France
- (3) CHAMARET Solange
324, rue Lecourbe 75015 PARIS France
- (4) CLAVEL François
83, rue de l'Assomption 75016 PARIS France
- (5) CHERMANN Jean Claude
2 Clos d'Ergal 78310 ELANCOURT France
- (6) BARRE-SINOUSSE Françoise
50, rue d'Ereva
92130 ISSY LES MOULINEAUX France

Date and 20 november 1984

signature(s) of Applicant(s) or Agent

CABINET PLASSERAUD
By Procuration

Sgd. Illeg.

DOCUMENT INCLUDING CORRECTIONS

PAGE(S) OF DESCRIPTION OR CLAIMS OR SHEET(S) OF DRAWING			R.M.*	DATE OF CORRESPONDENCE	DATE STAMP OF CORRECTOR
Modified	Removed	Added			
16		17, 18	+	20 11 84	12 DEC 1984 MP

* A change made in the wording of the original claims, except if the latter arises from the arrangements of article 26 of the decree of 19 September 1979, is indicated by the note "R.M." (modified claims).

PURIFIED VIRUS OF LYMPHADENOPATHIES AND OF THE ACQUIRED IMMUNO-DEPRESSIVE SYNDROME AND OF ENVELOPE ANTIGENS OF THIS VIRUS, PROCESS FOR PRODUCING THIS VIRUS AND OF THESE ENVELOPE ANTIGENS OF THIS VIRUS, USE OF THIS VIRUS OR OF THESE ANTIGENS IN THE PREPARATION OF IMMUNOGENIC COMPOSITIONS OR FOR THE DIAGNOSIS OF THE ABOVE - SAID DISEASES

The present invention relates to a purified virus of lymphadenopathies (denoted below by the abbreviation LAS) and of the acquired immuno-depressive syndrome (denoted below by the abbreviation AIDS), to a process for producing these antigens of the envelopes of these viruses, to their uses for the preparation of immunogenic compositions or for the diagnosis of the above-said diseases.

A retrovirus having characterizations of the etiological agent of AIDS has been identified. It is the subject of a first description in an article of F. BARRE-SINOUSSE et al, Science, 220, 868 (1983).

This retrovirus shows the following characteristics. It is T-lymphotropic; its preferred target is constituted by Leu 3 cells (or T4 lymphocytes); it has reverse transcriptase activity necessitating the presence of Mg^{2+} and shows strong affinity for poly(adenylate-oligodeoxy-thymidylate) poly(A)-oligo(dT) 12-18 ; it has a density of 1.16-1.17 in a sucrose gradient, an average diameter of 139 nanometers and a nucleus having an average diameter of 41 nanometers; the lysates of this virus are recognized immunologically, these lysates contain a protein p25 recognized by the serums but which is not recognized immunologically by the protein p24 of the HTLVI and II viruses.

Retroviruses of this type (sometimes denoted by the generic abbreviation LAV) have been filed in the National Collection of Micro-organism Cultures of the

INSTITUT PASTEUR of Paris, under numbers I-232, I-240 and I-241. Virus strains similar to LAV in all respects from the morphological and immunological point of view have been isolated in other laboratories; reference is made; by way of examples; to the retrovirus strains named HTLV-III isolated by R.C. GALLO et al., Science, 224, 500 (1984) and by M.G. SARNGADHARAN et al., Science 224, 506 (1984) respectively and to the retrovirus isolated by M. JAY LEVY et al., Science, 225, 840-842 (1984), which virus was designated ARV. Reference is also made to European patent application filed 14 September 1984, with the priority of British patent application number 83 24800 filed 15 September 1983 as regards a more detailed description of the LAV retroviruses or the like and of the uses to which extracts of these viruses give rise.

Only the internal antigens (core) to the virus have been recognizable, after lysis of the virus, through serums of patients affected by AIDS or by LAS. A protein p41 has been described in the above-said articles on HTLV3 as a possible component of the envelope of the virus. However, the formal proof that it was an envelope protein has not been given.

Processes for obtaining a LAV virus have also been described. Reference may be made particularly to the article already mentioned of F. BARRE-SINOUSSE et al. as regards the preparation of the virus in T lymphocyte cultures derived either from blood, or from the umbilical cord, or also from bone marrow cells of adult donors in good health. This process comprises particularly the following essential steps:

- a viral infection of these T lymphocytes, after activation by a lectin mitogen, with a viral suspension derived from a crude supernatant liquor of lymphocytes producing the virus (initially obtained from a patient infected with AIDS or LAS),

- culturing cells infected with TCGF, in the presence of anti-X-interferon sheep serum,
- purification of the virus produced (production starts generally between the ninth and the fifteenth day following infection and lasts from 10 to 15 days), which purification comprises precipitating the virus in polyethylenglycol in order to produce a first concentration of the virus, then centrifuging the preparation obtained in a 20-60% sucrose gradient or in an isotonic gradient of metrizanide (sold under the trade mark NYCODENZ by NYEGAARD, Oslo) and recovering the virus with the band of suitable density of 1.16-1.17 in the ^{case of} sucrose gradient or of 1.10-1.11 in a NYCODENZ gradient.

The LAV virus may also be produced from permanent cell lines of type T, such as the CEM line, or from B lymphoblastoid cell lines, such as obtained by the transformation of the lymphocytes B derived from a healthy donor with the Epstein-Barr virus. The cell lines obtained are then capable of producing continuously a virus (LAV-B) which possess the essential antigenic and morphological features of the LAV viruses (except that it is collected in a density band sometimes slightly higher than in the preceding case (particularly 1.18) in sucrose. The final purification of the virus can also be carried out in a NYCODENZ gradient. Reference may be made for the general techniques of production of LAV-B type viruses to French patent application Nr. 84 07151 filed May 9, 1984.

The invention relates to a novel variety of purified retrovirus, related to those which have been defined above, but which is distinguished therefrom (or which is characterized) by the fact that these viruses include one or several antigens, showing the characteristics of a glycoprotein in the tests which are described below, these antigens being detectable by labelling the virus with labelled cysteine, particularly ³⁵S-cysteine, in

sufficiently high concentration for this purpose in the culture medium of the virus, particularly in the proportion of 200 microcuries per ml of medium, devoid of unlabelled cystein. These antigens are recognized selectively by the serums of patients affected by AIDS or by LAS or by the serums of asymptomatic carriers of the virus.

A preferred antigen according to the preceding definition, as may be obtained from a lysate of this virus (or by gentle scouring of the envelopes of the virus), has a molecular weight of the order of 110,000 daltons, and this molecular weight can be evaluated in a system of comparative migration distances of said antigen and of proteins of respectively known molecular weights (PM), particularly the following proteins (marketed by AMERSHAM) and of

- lysozyme-(^{14}C)-methyl (MW: 14,300),
- carbon dioxide-(^{14}C)-methyl (MW: 30,000),
- ovalbumin-(^{14}C)-methyl (MW: 46,000),
- bovin albumin serum (^{14}C)-methyl (MW: 69,000),
- phosphorylase b-(^{14}C)-methyl (MW: 92,500),
- myosine-(^{14}C)-methyl (MW: 200,000).

The comparison migrations were carried out on 12.5% polyacrylamide gel, then under a voltage of 35 V. for 18 hours.

The invention relates also to the antigens themselves, particularly that of molecular weight of about 110,000, which possess also the capability of being recognized by serums of patients infected with AIDS or LAS or by serums of persons who have been exposed to LAV viruses or those analogous with the latter. These antigens have also the characteristic of forming complexes with concanavaline A, said complex being dissociatable in the presence of O-methyl- α -D-mannopyranoside. The antigens according to the invention can also bind to other lectins for example those known under the name

"LENTYL-LECTIN". The preferred antigen according to the invention, of molecular weight 110,000, is also sensitive to the action of endoglycosidases. This action is manifested by the production from the antigen of molecular weight 110,000 of a protein having a molecular weight of the order of 90,000, the latter being separable for example by immunoprecipitation or by separation employing the differences in molecular weights (migrations differentiated on gel).

Preferred antigens of the invention are constituted by glycoproteins.

The invention relates also to a process for producing the viruses according to the invention. This process distinguishes essentially from those recalled above at the level of the final purification operation. In particular, the purification step of the process according to the invention is no longer carried out in gradients, but involves the performance of differential centrifugations effected directly on the supernatants of the culture media of the producing cells. These centrifugation operations comprise particularly a first centrifugation at an angular centrifugation velocity, particularly of 10,000 rpm, enabling the removal of non-viral constituents, more particularly of cellular constituents, then a second centrifugation at higher angular velocity, particularly at 45,000 rpm, to obtain the precipitation of the virus itself. In preferred embodiments, the first centrifugation at 10,000 rpm, is maintained for 10 minutes and the second at 45,000 rpm, for 20 minutes. These are, of course, only indicative values, it being understood that it remains within the ability of the specialist to modify the centrifugation conditions, to provide for the separation of the cellular constituents and of the viral constituents.

This modification of the purification process results in the production of viral preparations from which

the antigen mentioned can then be isolated more easily, than from virus preparations purified by the previous methods. In any event, the viruses finally obtained by the process of the present invention are more easily recognized by serums of patients or of persons who have been exposed to the LAV virus or to morphologically and antigenically similar strains.

The antigen according to the invention can themselves be obtained from the latter viruses, by lysis (or other suitable processing) of the latter in the presence of any suitable detergent and by recovery and separation of the antigens released. Advantageously, the lysis of the virus is effected in the presence of aprotinine or of any other agent suitable for inhibiting the action of proteases. The separation of the antigens according to the invention can then be carried out by any method known in itself; for example, it is possible to proceed with a separation of the proteins by employing their respectively different migrations in a predetermined gel, the protein sought being then isolated from the zone of the gel in which it would normally be found in an electrophoresis operation under well determined conditions, having regard to its molecular weight. The antigens according to the invention can however be separated from the lysate of the above-said viruses, due to their affinity for lectins, in particular concanavaline A or lentyl-lectin. The lectin used is preferably immobilised on a solid support, such as the cross linked polymer derived from agarose and marketed under the trademark SEPHAROSE. After contacting the lysate in a suitable buffer, the antigen retained can be eluted in any suitable manner, particularly by resorting to a solution O-methyl- α -D-mannopyranoside.

A more thorough purification of these antigens can be performed by immunoprecipitation with the serums of patients known to possess antibodies effective against said protein, with concentrated antibody preparations

(polyclonal antibodies) or again with monoclonal antibodies, more particularly directed against the antigen according to the invention, in particular that having the molecular weight of 110,000, denoted below by the abbreviation gp110.

Additional characteristics of the invention will appear also in the course of the description which follows of the isolation of the virus according to the invention and of an envelope antigen of this virus. Reference will be made to fig. 1, which is derived from a photographic reproduction of strips of gel which have been used to carry out electrophoreses of extracts of lysates of T lymphocytes, respectively infected and uninfected (controls) by a LAV suspension.

T lymphocytes derived from a healthy donor and infected with LAV1, under the conditions described by F. BARRE-SINOUSSE et Coll., on CEM cells derived from a patient afflicted with leukemia and also infected in vitro with LAV1, were kept under cultivation in a medium containing 200 microcuries of ^{35}S -cystein and devoid of unlabelled cystein. The infected lymphocytes were cultured in a non-denaturing medium to prevent the degradation of the antigen sought. The supernatant liquor from the culture medium was then subjected to a first centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes to remove the non-viral components, then to a second centrifugation at 45,000 rpm for 20 minutes to sediment the virus. The virus pellet was then lysed by detergent in the presence of aprotinin (5%) particularly under the conditions described in the article of F. BARRE-SINOUSSE et Coll.

The same operations are repeated on lymphocytes taken up from a healthy donor as control.

The various lysates were then immunoprecipitated by serums of patients infected with AIDS or with LAS. Serums originating from healthy donors or of donors infected with other diseases were immunoprecipitated too.

The media were then subjected to electrophoreses in a SDS-polyacrylamide gel.

The results are indicated in fig. 2. The gel strips numbered from 1 to 5 were obtained from preparations labelled by ^{35}S -cystein. The strips numbered 7 to 10 correspond to the results observed on infected or uninfected lymphocyte preparations labelled with ^{35}S -methionine. Finally the strip II corresponds to the migration distances of the standard proteins identified above, whose molecular weights are recalled in the right-hand portion of the figure.

The references to the labelled viral proteins appear on the left-hand side of the figure.

It is noted that columns 7 to 9 show the specific protein p25 of LAV, labelled with ^{35}S -methionin, the same protein being absent from strips 3 to 10 corresponding to an observation made on preparations originating from healthy lymphocytes.

Columns 3 and 5 correspond to the results which have been observed on preparations obtained from lymphocytes infected and labelled with ^{35}S -cystein. Also found again were both the proteins p25 and p13 characteristic of the proteins of the nucleotide of LAV and the glycoprotein gp110 also specific of LAV. Also seen to appear in the various preparations, although less distinctly, were images corresponding to a protein p41 (molecular weight of the order of 41,000) and non-specific of virus LAV. It is also observed in the controls.

The virus according to the invention and the antigen according to the invention can be either precipitated by lectins, particularly concanavaline A, or fixed to a SEPHAROSE-concanavaline A column. This fixation can particularly be carried out by contacting a lysate of the above-said virus in a suitable buffer enabling the following composition:

Tris	10 mM
NaCl	0.15 M
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM

Detergent marketed under the trademark TRITON 1%

pH 7.4

When the fixation has been achieved, the SEPHAROSE-concanavaline A is washed with a buffer of the same composition, except that the TRITON concentration is lowered to 0.1%. The elution is then effected with an 0.2 M O-methyl- α -D-mannopyranoside solution in the washing buffer.

The protein may be further concentrated by immunoprecipitation with antibodies contained in the serums of patients infected with AIDS or with polyclonal antibodies obtained from a serum derived from an animal previously immunised against the "unaltered" virus according to the invention or the above-said glycoprotein. The protein can then be recovered by dissociation of the complex by a solution having an adequate content of ionic salt.

Preferably the antibody preparation is itself immobilised in a manner known in itself on an insoluble support, of the SEPHAROSE E type.

It is also possible to resort to monoclonal antibodies secreted by hybridomas previously prepared against gp 110. These monoclonal antibodies, as well as the hybridomas which produce them, also form part of the invention.

The conditions in which the monoclonal antibodies according to the invention may be prepared are described below.

Immunisation of the mice

Groups of Balb/c mice from 6 to 8 weeks old were used. One group received the virus including the above-said glycoprotein, another glycoprotein gp110. The immu-

nisation procedure, identical for the 4 mice, comprised the injection, intraperitoneally with three repeats, then once intravenously, of 10 μ g of antigenic preparation in the presence of Freund complete adjuvant at day 0, Freund incomplete adjuvant at day 14 and without adjuvant at days 28 and 42.

Fusion and culture of the hybrids

The non-secreting myeloma variant 5.53 PX x 63 Ag8, resistant to azaguanine, itself derived from the MOPC-21 cell-line, is used. Fusion with immunised mouse splenocytes is carried out in the presence of polyethylene-glycol 4000 by the technique of FAZEKAS de ST GROTH and SCHEIDEGGER on the 45th day (8). The selection of the hybrids in RPMI 16-40 "HAT" medium is carried out in plates having 24 cups (COSTAR) by the same culture technique.

The hybridomas producing antibodies of adequate specificity are then cloned in plates having 96 cups, in the presence of a "feeder" layer of syngenic thymocytes. The producing clones thus selected are then expanded in 24 cup plates, still in the presence of thymocytes. When the confluence appears in one of the cups, the clone is injected intraperitoneally into a BALB/c mouse which had received an injection of PRISTANE 6 days previously and/or kept in liquid culture.

Demonstration of the anti-LAV antibodies

Five different techniques enable characterization of the clones producing antibodies of interesting specificity. In a first stage, the hybrids producing antibodies are determined by an ELISA test revealing mouse immunoglobulins in the supernatant liquors. From this first selection, supernatants are sought which have antibodies directed against viral constituents by means of an ELISA test revealing the anti-LAV antibodies (9) or by immunofluorescence on the virus-producing human cells. Finally the supernatant liquors are analysed by radio-immunopre-

cipitation of virus labelled with cystein and by the Western-Blot technique on viral preparation,⁽¹⁰⁾ which permitted the determination of the specificities of these anti-LAV antibodies.

RESULTS

Cells obtained from the various fusions are placed under culture in 648 cups. Their microscopic examination showed that the majority of these cups contain a single hybrid clone capable of growing in a "HAT" selective medium. More than 50% among them produce antibodies giving rise to a positive response under ELISA antiviral examination. The most representative fusions are tested by the Western-Blot technique and several of them were subcloned, taking into account their specificity their reactivity in antiviral ELISA and their behaviour under culture. Those hybrids which were more particularly selected were those which _____ selectively recognize the viral glycoprotein gp110 having a molecular weight corresponding to the viral glycoprotein 110 KD. All the sub-clonings gave rise to clones producing antibodies which, after expression, are injected into syngenic mice. Analysis of the specificities of the antibodies present in the different ascites liquids confirm the specificity of the antibodies of said ascites with respect to gp110.

The monoclonal antibodies obtained can themselves be employed to purify proteins containing an antigenic site also contained in gp110. The invention relates therefore also to this process of purification as such. This process is advantageously applied to virus lysates or T lymphocyte lysates or any other cells producing LAV or the like, when care has been taken to avoid the uncontrolled separation of gp110 _____

_____ prior to lysis thereof, (it being understood that the method can also be applied to any solution containing gp110 or a protein, polypeptide or gly-

coprotein comprising an antigenic site of the envelope protein and recognized by the monoclonal antibody, whatever the nature of this solution). For practicing this process, the monoclonal antibodies are advantageously immobilised on a solid support, preferably adapted to affinity chromatography operations. For example, these monoclonal antibodies are fixed to an agarose lattice with three-dimensional cross-linking, marketed under the trademark SEPHAROSE by the Swedish company PHARMACIA A.G., for example by the cyanogen bromide method.

The invention therefore also relates to a process for separating the antigens concerned, characterized by operations consisting of passing the medium which can contain them in contact with an affinity column bearing the above-said monoclonal antibodies, to selectively fix said polypeptides, proteins or glycoproteins, then recovering the latter by dissociation of the antigen-antibody complex by means of a suitable buffer, particularly a solution of adequate ionic strength, for example of a salt, preferably ammonium acetate (which leaves no residue upon freeze drying of the preparation). It is also possible to ^{resort to} a solution acidified to a pH 2-4 or to a glycine buffer at the same pH.

These antigens are themselves capable of being used as reagents, or even as in vitro diagnostic agents, for the detection of anti-LAV antibodies. It is self-evident that the invention relates also to polypeptide fractions which can have lower molecular weights, when they carry antigenic sites recognizable by the same monoclonal antibodies. It will be clear to the specialist that from the moment that monoclonal antibodies according to the invention are available, it is possible to envisage the isolation, from the above-indicated antigens of smaller peptide sequences containing the same antigenic sites, for example by resorting to techniques known in

themselves of cleaving the initial polypeptide by enzymes capable of cleaving the larger polypeptides at specific sites. By way of example of such proteins, may be mentioned the enzyme of Staphylococcus aureus V3, alpha-chymotrypsin, (mouse submaxillary gland protease) marketed by the BOEHRINGER company, Vibrio alginolyticus chemovar iophagus collagenase, which specifically recognizes said Gly-Pro and Gly-Ala peptides, etc..

It is also possible to seek polypeptides or antigen fragments of envelopes of the virus, cloning fragments excised from a cDNA constructed from genomes of different variants of LAV virus and the like.

Fig. 2 is representative of restriction maps of certain of these cDNAs, comprising a total of 9.1 to 9.2 kb. The polypeptides coded by fragments of cDNA situated in the region extending between the site KpnI (position 6100) with respect to restriction maps of fig. 3 and the site SglII (position 6150) will be of most particular interest. The presence of a characteristic site of an envelope antigen of LAV virus or the like in the polypeptide which can be expressed (in a suitable host cell previously transformed by such a fragment or by a vector containing this fragment) can be detected by any suitable immunochemical method.

The antigens of the type concerned can also be used to separate antibodies having the characteristics indicated above from a polyclonal mixture of antibodies. In this case, the polypeptides of the type concerned will in their turn be immobilized on an affinity chromatography support, for example of the type indicated above. The separation process will comprise consequently the step consisting of passing a solution containing the polyclonal antibodies in contact with immobilised polypeptides, and the recovery step of the antibodies retained by means of a solution or a buffer similar to this or that which has been contemplated above.

Finally, the invention relates to immunogenic compositions characterized by the association of an antigen according to the invention, as immunogenic principle, particularly in the proportion of 10 to 500, for example from 50 to 100 micrograms/kg, with a physiologically acceptable excipient enabling its administration to a living host, more particularly man, to confer on him an immunity with respect to said antigens, including whole LAV viruses or the like. These antigens constitute active principles whose immunogenicity can be employed each time that protection is sought in vivo against LAV viruses or viruses which are related to them.

The invention also relates to a process using antigens according to the invention for the detection of

the presence of anti-LAV antibodies, particularly in blood specimens coming from man or from animal, to effect the detection of AIDS or of SLAs.

Lastly the invention relates to a method of in vitro diagnosis employing an envelope antigen according to the present invention for the detection of anti-LAV antibodies in the serum of patients affected by the disease or persons immunized against the virus. IT relates more particularly to an outfit or "kit" comprising this antigen.

The method of diagnosis comprises particularly:

- the deposit of particular amounts of an antigen according to the present invention into the cups of a titration microplate;
- introduction into these cups of increasing dilutions of the serum to be diagnosed;
- incubation of the microplate;
- careful washing of the microplate;
- introduction into the cups of specific labelled antibodies of immunoglobulins from the blood, the labelling being carried out by means of an enzyme selected from among those which are capable of hydrolising a substrate

so that the latter then undergoes modification of its absorption of radiation, at least in a particular wave length band and

- the detection, preferably comparatively with respect to a control, of the extent of the hydrolysis of the substrate as a measurement of the potential risks or of the effective presence of the disease.

Of course, it is possible to carry out quantitative titrations of antibodies on the serum 3 studied.

Preferred methods employ immuno-enzymatic or immunofluorescent titrations, in particular in accordance with the ELISA technique. The titrations may be determinations by immunofluorescence or direct or indirect immuno-enzymatic determinations.

CLAIMS

1. Purified virus of the LAV type characterized by the fact that it comprises an envelope antigen having a molecular weight of the order of 110,000 daltons.

2. Envelope antigen of LAV virus or the like having a molecular weight of the order of 110,000 daltons.

CLAIMS

1. Retrovirus showing the characteristics of the etiological agent of AIDS, and more particularly of LAV retrovirus, characterized by the fact that it comprises one or several antigens showing characteristics of a glycoprotein and detectable by labelling of the virus by means of a high concentration of ³⁵S-cystein, particularly in the proportion of 200 microcuries per milliliter of medium, and this in the absence of unlabelled cystein, these antigens being also recognized selectively by serums of patients infected with AIDS or SLA, or again by serums of asymptomatic carriers of the virus.

2. Retrovirus according to claim 1, characterized by the fact that it comprises an envelope antigen having a molecular weight of the order of 110,000 daltons.

3. Antigen having a molecular weight of about 110,000 or antigen of lower molecular weight derived from the foregoing, which possesses the capacity of being recognized by serums of patients infected with AIDS or SLA or by serums of asymptomatic carriers of the virus.

4. Antigen according to claim 3, which shows also the characteristic of forming complexes with concanavalin A, said complex being dissociatable in the presence of O-methyl- α -D-mannopyranoside.

5. Antigen according to claim 3 or claim 4, characterized in that it can also be coupled to other lectins.

6. Antigen according to any one of claims 3 to 5, which has a molecular weight of the order of 110,000 daltons and which is also sensitive to the action of endoglycosidases.

7. Process for obtaining a retrovirus according to claim 1 or claim 2, comprising the infection of T lymphocyte lines or B lymphoblastoid cell lines, the culture of these infected cells and the purification of the virus obtained, characterized in that the final purification step of the virus comprises the carrying out of differential centrifugations operated directly on the supernatant liquors of the culture media of the producing cells and the final recovery of the virus, which is labellable with ³⁵S-cystein used in high concentrations and in the absence of unlabelled cysteins.

8. Process for obtaining an antigen according to any one of claims 3 to 6, comprising the isolation of this antigen from the purified virus obtained at the conclusion of claim 7, particularly by lysis of this virus or scouring of the envelopes of this virus, and the separation of the antigens which have the capacity of being recognized by serums of patients infected with AIDS or SIA, more particularly that which has a molecular weight of the order of 110,000.

9. Process according to claim 8, characterized in that the separation of the antigen comprises the contacting of the medium containing the antigen, such as obtained at the end of the process defined in claim 8 with a refined lectin, such as concanavalin A or lentyl-lectin, this lectin being preferably immobilised on the solid support, then elution of the above-said antigen, particularly by means of an O-methyl- α -D-mannopyranoside solution.

10. Process according to claim 8, characterized in that the above-said purification is carried out by immunoprecipitation by serums of patients known to possess active antibodies against said antigen or again with monoclonal antibodies produced by hybridomas previously formed and secreting said monoclonal antibodies, the latter recognizing more particularly the antigen according to any one of claims 3 to 6.

11. Monoclonal antibody characterized by its capacity to recognize specifically the antigen according to claim 6.

12. Hybridomas secreting monoclonal antibodies according to claim 11.

13. Immunogenic composition characterized by the association of an antigen according to any one of claims 3 to 6, with a physiologically acceptable excipient, enabling its administration to a living host, more particularly man.

14. Immunogenic composition according to claim 13, characterized in that it is dosed with antigen so as to permit administration of a dose of 10 to 500, particularly from 50 to 100 micrograms per kilogram.

15. Method of diagnosis comprising:

- the deposition of particular amounts of an antigen according to any one of claims 3 to 6 in the cups of a titration microplate;
- the introduction into these cups of increasing dilutions of the serum to be diagnosed;
- incubation of the microplate;

- careful washing of the microplate;
- introduction into the cups of the microplate of specific labelled antibodies of blood immunoglobulins, the labelling being carried out by an enzyme selected from among those which are capable of hydrolysing a substrate so that the latter then undergoes modification of its absorption of radiation, at least in a particular band of wave length and
- the detection, preferably comparatively with respect to a control, of the amount of hydrolysis of the substrate as a measurement of the potential risks or of the effective presence of the disease.

(two sheets of drawings appended)

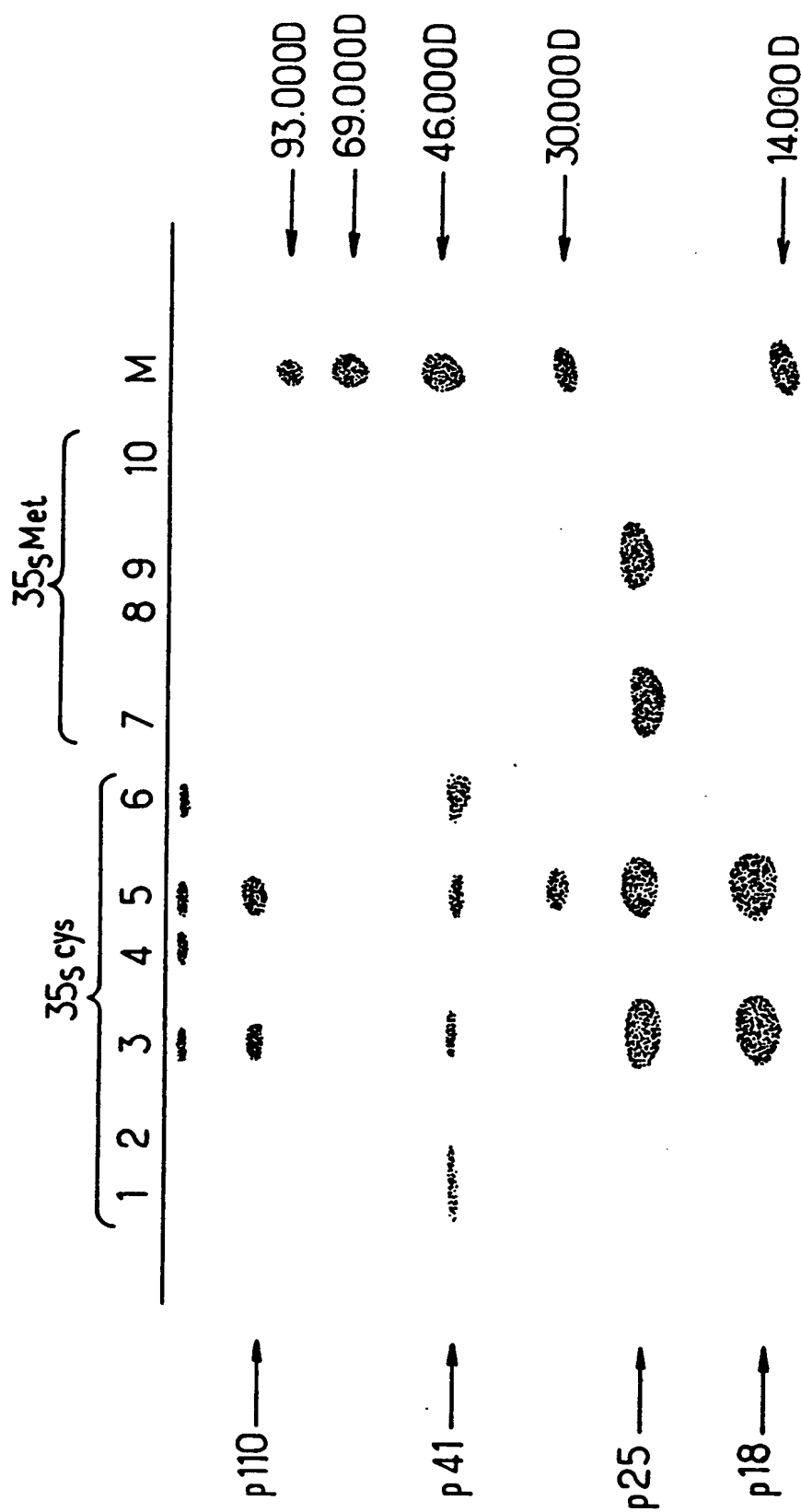


FIG.1.

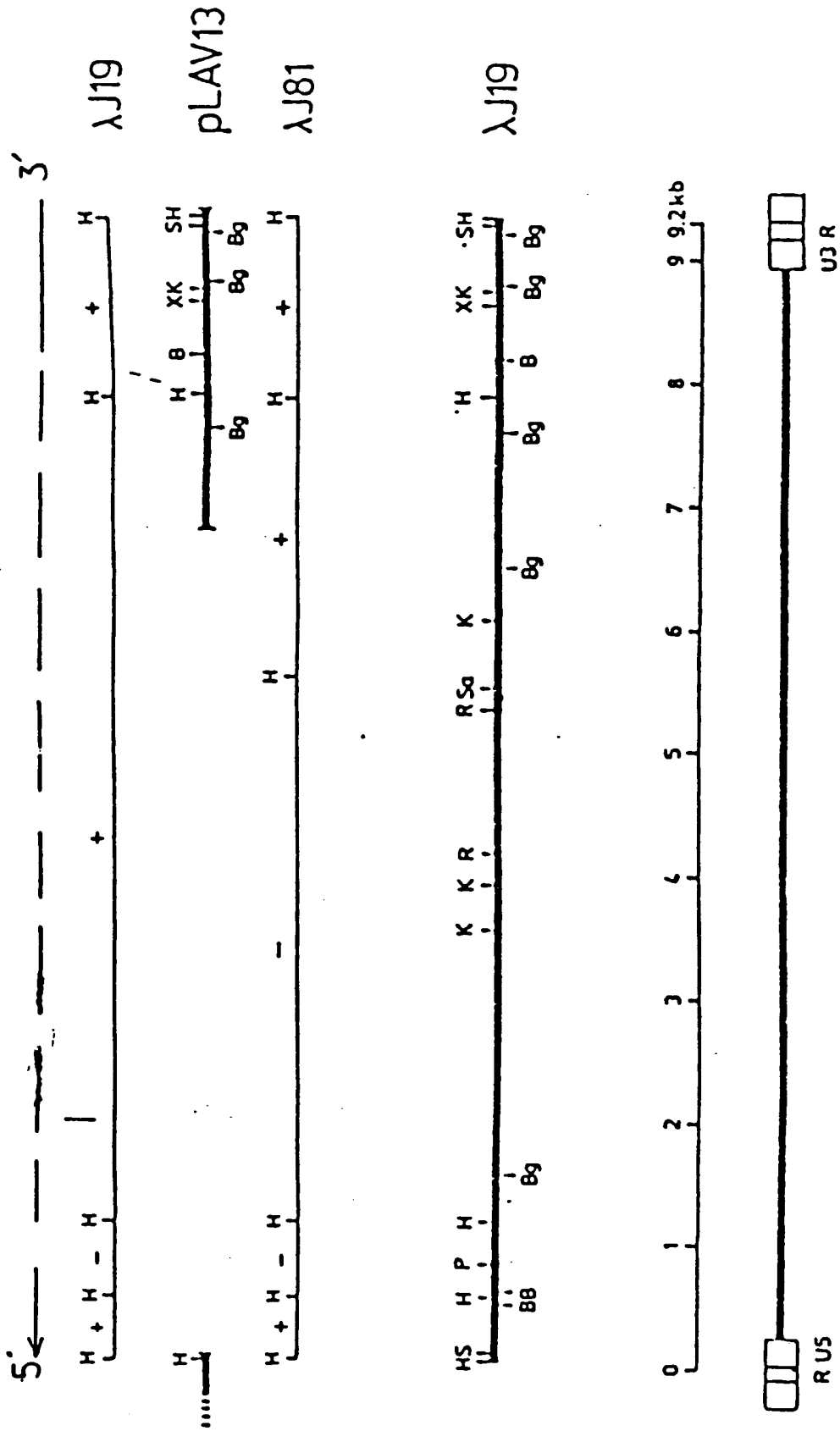


FIG. 2.

H = Hind III
S = Sac I
B = Bam HI
P = Pst I
Bg = Bgl II
K = Kpn I
R = EcoRI
Sa = Sal I
X = Xho I

C L A I M S

1. Purified antigen having a molecular weight of about 110.000 or antigen of lower molecular weight derived from the foregoing, which possesses the capacity of being recognized by serums of patients infected with AIDS or SLA or by serums of asymptomatic carriers of the virus.
2. Antigen according to claim 1, characterized in that it consists in a glycoprotein.
3. Antigen according to claim 1, or to claim 2, characterized by the fact that it consists in an antigen from the envelope of the LAV retrovirus, this antigen being detectable by labelling of the virus by means of a high concentration of ³⁵S-cystein, particularly in the proportion of 200 microcuries per milliliter of medium, and this in the absence of unlabelled cystein.
4. Antigen according anyone of the claims 1 to 3, which shows also the characteristic of forming complexes with concanavalin A, said complex being dissociatable in the presence of O-methyl- α -D-nannopyranoside.
5. Antigen according to claim 4, characterized in that it can also be coupled to other lectins.
6. Antigen according to claim 3 or 4, characterized in that it is also sensitive to the action of endoglycosidases.
7. Process for obtaining a retrovirus having an antigen according to any one of claims 1 to 6 and capable of being detected by labelling the retrovirus by means of a high concentration of ³⁵S-cystein, particularly in the proportion of 200 microcuries per milliliter of medium, and this in the absence of unlabelled cystein, this process comprising the infection of T lymphocyte lines or B lymphoblastoid cell

lines, the culture of these infected cells and the purification of the virus obtained, characterized in that the final purification step of the virus comprises the carrying out of differential centrifugations operated directly on the supernatant liquors of the culture media of the producing cells and the final recovery of the virus, which is labellable with ^{35}S -cystein used in high concentrations and in the absence of unlabelled cysteins.

8. Process for obtaining an antigen according to any one of claims 3 to 6, comprising the isolation of this antigen from the purified virus obtained at the conclusion of claim 7, particularly by lysis of this virus or scouring of the envelopes of this virus, and the separation of the antigens which have the capacity of being recognized by serums of patients infected with AIDS or SLA, more particularly that which has a molecular weight of the order of 110.000.

9. Process according to claim 8, characterized in that the separation of the antigen comprises the contacting of the medium containing the antigen, such as obtained at the end of the process defined in claim 8 with a refined lacin, such as concanavalin A or lentyl-lectin, this lectin being preferably immobilised on the solid support, then elution of the above-said antigen, particularly by means of an O-methyl- α -D-mannopyranoside solution.

10. Process according to claim 8, characterized in that the above-said purification is carried out by immunoprecipitation by serums of patients known to possess active antibodies against said antigen or again with monoclonal antibodies produced by hybridomas previously formed and secreting said monoclonal antibodies, the latter recognizing more particularly the antigen according to any one of claims 3 to 6.

11. Monoclonal antibody characterized by its capacity to recognize specifically the antigen according to claim 6.

12. Hybridomas secreting monoclonal antibodies according to claim 11.

13. Immunogenic composition characterized by the association of an antigen according to any one of claims 3 to 6, with a physiologically acceptable excipient, enabling its administration to a living host, more particularly man.

14. Immunogenic composition according to claim 13, characterized in that it is dosed with antigen so as to permit administration of a dose of 10 to 500, particularly from 50 to 100 micrograms per kilogram.

15. Method of diagnosis comprising :

- the deposition of particular amounts of an antigen according to any one of claims 1 to 6 in the cups of a titration microplate ;
- the introduction into these cups of increasing dilutions of the serum to be diagnosed ;
- incubation of the microplate ;
- careful washing of the microplate ;
- introduction into the cups of the microplate of specific labelled antibodies of blood immunoglobulins, the labelling being carried out by an enzyme selected from among those which are capable of hydrolysing a substrate so that the latter then undergoes modification of its absorption of radiation, at least in a particular band of wave length and
- the detection, preferably comparatively with respect to a control, of the amount of hydrolysis of the substrate as a measurement of the potential risks or of the effective presence of the disease.